FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human CD68
Clone PG-M1
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Code IS613

ENGLISH

Intended use
For in vitro diagnostic use.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, Clone PG-M1, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistotochemistry together with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. This antibody labels macrophages and is useful for the identification of M4 (myelomonocytic) and M5 (monocytic) types of acute myeloid leukemia (AML), and histiocytic sarcoma (1). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Summary and explanation
CD68 is a highly glycosylated lysosomal membrane protein with a Mr of 110 000. The CD68 protein belongs to a family of lysosomal glycoprotein (LGP)/plasma membrane shuttling proteins that play a role in endocytosis and/or lysosomal trafficking.

CD68 is expressed strongly in cytoplasmic granules, and weakly on the surface of macrophages, monocytes, neutrophils, basophils and NK cells. Additionally, CD68 is expressed by approximately 40% of peripheral blood B cells and is weakly expressed in 50% of B-cell type acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) cells. CD68 can also be found in the cytoplasm of non-haematopoietic tissues, especially the liver, and renal glomeruli and tubules (2). Unlike many other CD leucocyte antigens, the CD68 molecule is antigenically very heterogenous, and different antibodies to CD68 show different cellular reactivities (3).

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided
Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.
Clone: PG-M1 (3). Isotype: IgG3, kappa.

Immunogen
Human mononuclear spleen cell preparation containing more than 80% Gaucher's cells (3).

Specificity
Anti-Human CD68, clone PG-M1, was clustered as anti-CD68 at the Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4).

The antibody labels COS-1 and WOP cells transfected with CD68 cDNA. Unlike other CD68 antibodies, which label both macrophages and myeloid cells, the PG-M1 antibody detects a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 antigen (3).

Precautions
1. For professional users.

2. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.

3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.

5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage
Store at 2-8 ℃. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation including materials required but not supplied
The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004).

Paraffin-embedded sections: Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using the 3-in-1 specimen preparation procedure for Dako PT Link. Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004). Note: After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

Deparaffinized sections: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link and following the same procedure as described for paraffin-embedded sections. After staining the slides should be mounted using aqueous or permanent mounting medium.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.

Staining procedure including materials required but not supplied
The recommended visualization system is EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols:

Template protocol: FLEXRTU2 (200 µL dispense volume) or FLEXRTU3 (300 µL dispense volume)

Autoprogram: CD68PG (without counterstaining) or CD68PGH (with counterstaining).

The Auxiliary step should be set to "rinse buffer" in staining runs with ≤10 slides. For staining runs with >10 slides the Auxiliary step should be set to "none". This ascertains comparable wash times.

All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator's Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer instrument, please contact Dako Technical Services.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. If the evaluating pathologist should desire a different staining intensity, a Dako Application Specialist/Technical Service Specialist can be contacted for information on re-programming of the protocol. Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the staining pattern is identical to the staining pattern described in "Performance characteristics".

Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018). Non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include tonsil and brain and the cells/structures should display reaction patterns as described for these tissues in "Performance characteristics" in all positive specimens. The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code IS750).

Staining interpretation
Cells of the monocyte/macrophage lineage labeled by the antibody display cytoplasmic (diffuse or granular) staining.

Performance characteristics
Normal tissues: In normal peripheral blood the antibody labels only monocytes. In a wide range of tissues tested, all macrophages were labeled. In bone marrow also osteoclasts were positive, whereas granulocytes and myeloid precursors were consistently negative. A weak reactivity of some megakaryocytes was observed in about 20% of the cases. Kuppfer's cells in the liver, mast cells and synovial cells were the only additional normal cells labeled by the antibody (3). Macrophages in the germinal centers of tonsil show a moderate to strong staining reaction, whereas the microglial cells in brain show a weak to moderate staining reaction

Abnormal tissues: Among 431 malignancies of the lymphohemopoietic system, reactivity with the antibody was restricted to acute myeloid leukemias of the M4 and M5 type, true histiocytic sarcomas, and mastocytosis. Consistently negative were acute myeloblastic leukaemias of M1, M2, and M3 type, malignant non-Hodgkin's lymphomas of B- and T-cell type, Hodgkins lymphoma, acute lymphoblastic leukemias, and chronic myeloid leukemia. The majority of 370 non-haematopoietic tumours were negative with the antibody, exceptions being 15/15 granular cell myoblastomas, 6/13 kidney clear cell carcinomas, 4/10 glioblastomas, 10/18 meningiomas and 5/50 melanomas, and, as expected, 2/2 giant cell tumours of the bone, and 7/7 xanthogranulomas (3). The PG-M1 antibody labels some non-haematopoietic malignancies, especially about 10% of melanomas (3), therefore the diagnosis of histiocytic sarcoma should always be supported by positivity of neoplastic cells for at least another macrophage-restricted marker and/or the leucocyte common antigen, and negativity for epithelial and melanoma-associated antigens (1).

FRANÇAIS

Utilisation prévue
Pour utilisation diagnostique *in vitro.*

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, clone PG-M1, Ready-to-Use, (Link), est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec les instruments Autostainer Link. Cet anticorps marque les macrophages et est utile pour l'identification des types M4 (myélomonocytaire) et M5 (monocytaire) de la leucémie aiguë myéloïde (LAM), et du sarcome histiocytaire (1). L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Résumé et explication
La CD68 est une protéine membranaire lysosomale très glycosylée d'un poids moléculaire de 110 000. La protéine CD68 appartient à une famille de glycoprotéines lysosomales (LGP)/protéines navette de la membrane cytoplasmique qui jouent un rôle dans l'endocytose et/ou dans le trafic lysosomal.

La CD68 est fortement exprimée dans les granules cytoplasmiques, et faiblement exprimée à la surface des macrophages, des monocytes, des neutrophiles, des basophiles et des cellules NK. De plus, la CD68 est exprimée par environ 40 % des lymphocytes B du sang périphérique et est faiblement exprimée par 50 % des cellules de leucémie aiguë lymphoblastique à lymphocytes B (LAL-B). La CD68 peut également être présente dans le cytoplasme de tissus non hématopoïétiques, en particulier dans le foie et dans les tubules et glomérules rénaux (2). À la différence de nombreux autres antigènes leucocytaires CD, la molécule de CD68 est très hétérogène d'un point de vue antigénique, et différents anticorps anti-CD68 présentent différentes réactivités cellulaires (3).

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Réactifs fournis
Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.
Clone : PG-M1 (3). Isotype : IgG3, kappa.

Immunogène
Préparation de cellules humaines mononucléées de la rate contenant plus de 80 % de cellules de Gaucher (3).

Spécificité
Anti-Human CD68, clone PG-M1, a été classé comme un anti-CD68 à la Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Cinquième Conférence et Atelier Internationaux sur les Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains (HLDA)) qui s'est tenu à Boston en 1993 (4).

L'anticorps marque les cellules COS-1 et WOP transfectées avec l'ADNc de la CD68. À la différence des autres anticorps anti-CD68 qui marquent les macrophages et les cellules myéloïdes, l'anticorps PG-M1 détecte un épitope résistant aux fixateurs sur la forme de l'antigène CD68 qui est spécifique aux macrophages (3).

Précautions
1. Pour utilisateurs professionnels.

2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.

3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.

4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.

5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation
Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni
L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus inclus en paraffine et fixés au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Un prétraitement avec démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire avec le Dako PT Link (Réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004).

Coupes incluses en paraffine : le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine est recommandé à l'aide de la procédure de préparation d'échantillon 3-en-un pour le Dako PT Link. Suivre la procédure de prétraitement indiquée dans la notice de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004). Remarque : après coloration, les coupes doivent être déshydratées, lavées et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

Coupes déparaffinées : le prétraitement des coupes tissulaires déparaffinées, fixées au formol et incluses en paraffine, est recommandé à l'aide du Dako PT Link, en suivant la même procédure que pour les coupes incluses en paraffine. Après coloration, un montage aqueux ou permanent des lames est recommandé.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames FLEX IHC Microscope Slides (Réf. K8020).

Procédure de coloration y compris le matériel requis mais non fourni
Le système de visualisation recommandé est le EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010). Les étapes de coloration et d'incubation sont préprogrammées dans le logiciel des instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus, à l'aide des protocoles suivants :

Protocole modèle : FLEXRTU2 (volume de distribution de 200 µL) ou FLEXRTU3 (volume de distribution de 300 µL)

Autoprogram : CD68PG (sans contre-coloration) ou CD68PGH (avec contre-coloration).

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

L'étape Auxiliary doit être réglée sur « rinse buffer » lors des cycles de coloration avec ≤10 lames. Pour les cycles de coloration de >10 lames, l'étape Auxiliary doit être réglée sur « none ». Cela confirme des temps de lavage comparables.

Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Dako Autostainer utilisé, contacter le service technique de Dako.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement. Si le pathologiste qui réalise l'évaluation désire une intensité de coloration différente, un spécialiste d'application/spécialiste du service technique de Dako peut être contacté pour obtenir des informations sur la re-programmation du protocole. Vérifier que l'exécution du protocole modifié est toujours valide en vérifiant que le schéma de coloration est identique au schéma de coloration décrit dans les « Caractéristiques de performance ».

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide d'hématoxyline EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8018). L'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

Des contrôles positifs et négatifs doivent être réalisés en même temps et avec le même protocole que les échantillons du patient. Les tissus de contrôle positifs doivent comprendre les amygdales et le cerveau et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que décrits pour ces tissus dans les « Caractéristiques de performance » dans tous les échantillons positifs. Le contrôle négatif recommandé est le FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. IS750).

Interprétation de la coloration
Les cellules de la lignée monocytaire/macrophagique marquées par l'anticorps présentent une coloration cytoplasmique (diffuse ou granulaire).

Caractéristiques de performance
Tissus sains : Dans le sang périphérique normal, l'anticorps marque uniquement les monocytes. Dans un grand nombre de tissus testés, tous les macrophages étaient marqués. Dans la moelle osseuse également, les ostéoclastes étaient positifs, alors que les granulocytes et les précurseurs myéloïdes étaient invariablement négatifs. Une faible réactivité de certains mégacaryocytes a été observée dans environ 20 % des cas. Les cellules de Kupffer du foie, les mastocytes et les cellules synoviales étaient les seules autres cellules normales à être marquées par l'anticorps (3). Les macrophages des centres germinatifs des amygdales ont présenté une coloration modérée à forte, tandis que la coloration des cellules microgliales du cerveau était faible à modérée.

Tissus tumoraux : Sur 431 cas de cancers du système lympho-hématopoïétique, la réactivité avec l'anticorps était limitée aux leucémies aiguës myéloïdes de types M4 et M5, aux vrais sarcomes histiocytaires et aux mastocytoses. Des résultats négatifs constants ont été obtenus pour les leucémies aiguës myéloblastiques de types M1, M2 et M3, les lymphomes malins non hodgkiniens à lymphocytes B et T, le lymphome de Hodgkin, les leucémies aiguës lymphoblastiques et la leucémie myéloïde chronique. Les 370 tumeurs non hématopoïétiques étaient pour la plupart négatives à l'anticorps, à l'exception de 15 cas sur 15 de myoblastomes à cellules granulaires, 6 cas sur 13 de carcinomes à cellules claires du rein, 4 cas sur 10 de glioblastomes, 10 cas sur 18 de méningiomes et 5 cas sur 50 de mélanomes et, comme prévu, 2 cas sur 2 de tumeurs des os à cellules géantes et 7 cas sur 7 de xanthogranulomes (3). L'anticorps PG-M1 marque quelques cancers non hématopoïétiques, en particulier 10 % des mélanomes (3). Par conséquent le diagnostic du sarcome histiocytaire doit toujours être confirmé par une positivité des cellules néoplasiques à au moins un autre marqueur spécifique des macrophages et/ou à l'antigène leucocytaire commun, et par une négativité aux antigènes associés aux épithéliums et aux mélanomes (1).

DEUTSCH

Zweckbestimmung
Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, Clone PG-M1, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper markiert Makrophagen und dient zur Identifizierung von M4- (myelomonozytischen) und M5- (monozytischen) Typen akuter myeloider Leukämie (AML) sowie histiozytischer Sarkome (1). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit ordnungsgemäßen Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Zusammenfassung und Erklärung
CD68 ist ein hochglykosyliertes Membranprotein mit einem Mr von 110.000. Das CD68-Protein zählt zu einer Familie von Lysosomal-Glykoprotein (LGP)-/Plasmamembran-Shuttleproteinen, die bei der Endozytose bzw. beim lysosomalen Trafficking eine Rolle spielen.

CD68 wird in zytoplasmatischen Granula stark und auf der Oberfläche von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, Basophilen und NK-Zellen schwach exprimiert. Außerdem wird CD68 von ca. 40 % der B-Zellen im peripheren Blut exprimiert und bei 50 % der Zellen bei akuter lymphoblastischer Leukämie des B-Zellen-Typs (B-ALL) schwach exprimiert. CD68 tritt auch im Zytoplasma von nicht-hämatopoietischen Geweben, insbesondere der Leber, und in Nierenglomeruli und -tubuli auf (2). Anders als viele anderen CD-Leukozyten-Antigene ist das CD68-Molekül antigen sehr heterogen, und verschiedene Antikörper gegen CD68 weisen unterschiedliche zelluläre Reaktivitäten auf (3).

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz
Gebrauchsfertiger, monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0,015 mol/L Natriumazid enthält.

Klon: PG-M1 (3). Isotyp: IgG3, Kappa.

Immunogen
Präparat aus menschlichen mononukleären Milzzellen mit mehr als 80 % Gaucher-Zellen (3).

Spezifität
Anti-Human CD68, Clone PG-M1 wurde bei dem/der Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5. Internationale(r) Workshop und Konferenz über leukozytendifferenzierende Antigene) als Anti-CD68 geclustert (4).

Der Antikörper markiert COS-1 und WOP-Zellen, die mit CD68-cDNA transfiziert sind. Im Gegensatz zu anderen CD68-Antikörpern, die sowohl Makrophagen als auch Myeloidzellen markieren, weist der PG-M1-Antikörper ein fixiermittelresistentes Epitop auf der makrophagenbeschränkten Form des CD68-Antigens nach (3).

Vorsichtsmaßnahmen
1. Nur für Fachpersonal bestimmt.

2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Natriumazid kann auch in als ungefährlich eingestuften Konzentrationen mit Blei- und Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Metallazidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.

3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.

4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.

5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung
Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Vorbereitung der Probe und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien
Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Die Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) mit Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) ist erforderlich. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004) erzielt werden.

Paraffineingebettete Schnitte: Die Vorbehandlung der formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitte mit dem 3-in-1-Probenvorbereitungsverfahren für Dako PT Link wird empfohlen. Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004) durchführen. Hinweis: Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit permanentem Einbettmedium auf den Objektträger aufgebracht werden.

Entparaffinierte Schnitte: Eine Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte mit Dako PT Link nach demselben Verfahren, wie für die paraffineingebetteten Schnitte beschrieben, wird empfohlen. Die Objektträger nach dem Färben mit einem wässrigen oder permanenten Einbettmedium bedecken.

Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Färbeverfahren und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien
Das empfohlene Visualisierungssystem ist EnVision™ FLEX+, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Software der Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräte mit den folgenden Protokollen vorprogrammiert:

Matrixprotokoll: FLEXRTU2 (200 µL Abgabevolumen) oder FLEXRTU3 (300 µL Abgabevolumen)

Autoprogram: CD68PG (ohne Gegenfärbung) oder CD68PGH (mit Gegenfärbung)

Bei Färbedurchläufen mit höchstens 10 Objektträgern sollte der „Zusatz"-Schritt auf „Pufferspülgang" eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit mehr als 10 Objektträgern den „Zusatz"-Schritt auf „Keine" einstellen. Dieses gewährleistet vergleichbare Waschzeiten.

Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nähere Einzelheiten bitte dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät entnehmen. Wenn die Färbeprotokolle auf dem verwendeten Dako Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, bitte den Technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Optimale Bedingungen können je nach Probe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Falls der beurteilende Pathologe eine andere Färbungsintensität wünscht, kann ein Anwendungsspezialist oder Kundendiensttechniker von Dako bei der Neuprogrammierung des Protokolls helfen. Die Leistung des angepassten Protokolls muss verifiziert werden, indem gewährleistet wird, dass das Färbemuster mit dem unter „Leistungsmerkmale" beschriebenen Färbemuster identisch ist.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden. Empfohlen wird ein nichtwässriges, permanentes Fixiermittel.

Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientenproben getestet werden. Das positive Kontrollgewebe sollte Mandelgewebe und Hirn enthalten und die Zellen/Strukturen müssen in allen positiven Proben die für dieses Gewebe unter „Leistungsmerkmale" beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativ-Kontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. IS750).

Auswertung der Färbung
Von Monozyten/Makrophagen abstammende Zellen, die vom Antikörper markiert werden, weisen eine zytoplasmatische (diffuse oder granuläre) Färbung auf.

Leistungsmerkmale
Gesundes Gewebe: Bei normalem peripherem Blut markiert der Antikörper nur Monozyten. Bei einer großen Anzahl getesteter Gewebe wurden alle Makrophagen markiert. Im Knochenmark waren auch Osteoklasten positiv, während Granulozyten und myeloische Vorläufer durchwegs negativ waren. Bei ungefähr 20 % der Fälle wurde eine schwache Reaktivität einiger Megakaryozyten beobachtet. Kupffer-Zellen in der Leber, Mastzellen und Synovialzellen waren die einzigen anderen gesunden Zellen, die vom Antikörper markiert wurden (3). Makrophagen in den Keimzentren der Mandeln weisen eine mäßige bis starke Färbereaktion auf, während die Mikrogliazellen im Hirn eine schwache bis mäßige Färbereaktion aufweisen.

Pathologisches Gewebe: Bei 431 Malignitäten des lymphohämopoietischen Systems war die Reaktivität mit dem Antikörper auf akute myeloische Leukämien des Typs M4 und M5, echte histiozytische Sarkome und Mastozytose beschränkt. Durchwegs negativ waren akute myeloblastische Leukämien des Typs M1, M2, und M3, maligne Non-Hodgkin-Lymphome des B- und T-Zellen-Typs, Hodgkin-Lymphome, akute lymphoblastische Leukämien und chronische myeloische Leukämie. Der Großteil von 370 nicht hämatopoietischen Tumoren reagierte negativ mit dem Antikörper, mit Ausnahme von 15 von 15 Körnerzellenmyoblastomen, 6 von 13 klarzelligen Nierenkarzinomen, 4 von 10 Glioblastomen, 10 von 18 Meningiomen und 5 von 50 Melanomen und, wie erwartet, 2 von 2 Riesenzellkarzinomen des Knochens und 7 von 7 Xanthogranulomen (3). Der PG-M1-Antikörper markiert einige nicht-hämatopoietische Malignitäten, insbesondere ca. 10 % der Melanome (3), daher sollte die Diagnose eines histiozytischen Sarkoms immer durch ein positives Testergebnis für neoplastische Zellen für mindestens einen anderen makrophagenbeschränkten Marker bzw. das Leucocyte Common Antigen sowie durch ein negatives Testergebnis für epithel- und melanomassoziierte Antigene (1) gestützt werden.

References/ Références/ Literatur

1. Falini B, Flenghi L, Pileri S, Stein H, Dürkop H, Pasqualucci L, et al. M15.1. PG-M1 a new mAb directed against a fixative-resistant, macrophage-restricted epitope of the CD68 molecule. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 928-30.
2. Goyert SM. MC12. CD68 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 1015-6.
3. Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H, et al. PG-M1: A new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. Am J Pathol 1993; 142:1359-72.
4. Cordell JL, Falini B, Flenghi L, Jones DB, Pileri S, Radzun HJ, et al. M15. CD68 cluster workshop report. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 925-7.

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

REF — Catalogue number / Référence catalogue / Bestellnummer	2 °C – 8 °C — Temperature limitation / Limites de température / Zulässiger Temperaturbereich	Use by / Utiliser avant / Verwendbar bis
IVD — In vitro diagnostic medical device / Dispositif médical de diagnostic in vitro / In-vitro-Diagnostikum	Σ — Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour <n> tests / Inhalt ausreichend für <n> Tests	Manufacturer / Fabricant / Hersteller
Consult instructions for use / Voir les instructions d'utilisation / Gebrauchsanweisung beachten	LOT — Batch code / Numéro de lot / Chargenbezeichnung	

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17